

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 07-265065

(43)Date of publication of application : 17.10.1995

(51)Int.Cl.

C12N 1/21  
C12N 15/09  
C12P 7/62  
// (C12N 1/21  
C12R 1:01 )  
(C12P 7/62  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 06-084084

(71)Applicant : KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 29.03.1994

(72)Inventor : SHIOMI HISAFUMI

## (54) TRANSFORMANT OF COPOLYMER BY SYNTHETIC GENE AND PRODUCTION OF COPOLYMER

(57)Abstract:

PURPOSE: To produce a copolymer comprising a 3-hydroxybutyrate and a 3- hydroxyhexanoate from inexpensive fats and oils or a fatty acid as a raw material in high yield.

CONSTITUTION: This transformant is obtained by transfecting or transducing a vector plasmid containing a synthetic gene for a copolymer comprising a 3-hydroxybutyrate and a 3- hydroxyhexanoate into a host microbial cell, especially the microbial cell of the genus *Aeromonas*. Furthermore, this transformant is prepared by transfecting or transducing the vector plasmid in which a  $\beta$ - ketothiolase gene or an acetoacetyl-CoA reductase gene or both are integrated into the host microbial cell. This method for producing the copolymer is to use the resultant transformant.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-265065

(43) 公開日 平成7年(1995)10月17日

(51) Int. Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 1/21		8828-4B		
15/09				
C 1 2 P 7/62		7432-4B		
// (C 1 2 N 1/21		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		審査請求 未請求 請求項の数5	FD (全 9 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-84084

(22) 出願日 平成6年(1994)3月29日

(71) 出願人 000000941

鐘淵化学工業株式会社

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

(72) 発明者 塩見 尚史

兵庫県高砂市西畑1丁目13番2-303

(74) 代理人 弁理士 細田 芳徳

(54) 【発明の名称】 共重合体の合成遺伝子による形質転換体および共重合体の製造方法

(57) 【要約】

【構成】 3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体の合成遺伝子を含むベクタープラスミドを宿主菌体内、特にアエロモナス属の菌体内に移入して得られる形質転換体、およびさらにβ-ケトチオラーゼ遺伝子および/またはアセトアセチルC<sub>6</sub>Aリダクターゼ遺伝子が組み込まれたベクタープラスミドを宿主菌体内に移入して得られる形質転換体、並びにこれらの形質転換体を用いる該共重合体の製造方法。

【効果】 本発明の形質転換体および本発明の製造方法を用いることにより、3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体を、安価な油脂や脂肪酸を原料に高収率で生産することができる。

## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 3-ヒドロキシブチレートと 3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体の合成遺伝子を含有するベクタープラスミドを宿主菌体内に移入して得られる形質転換体。

【請求項 2】 さらに  $\beta$ -ケトチオラーゼ遺伝子および/またはアセトアセチル CoA リダクターゼ遺伝子が組み込まれたベクタープラスミドを宿主菌体内に移入して得られる請求項 1 記載の形質転換体。

【請求項 3】 宿主菌がアエロモナス属の菌株であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の形質転換体。

【請求項 4】 ベクタープラスミドが pLA2917、pLA2905、pLA2910、pLA2901、pRK248、pRK290、pLAFR1、pVK100、pVK101、pVK102 よりなる群から選択されるものであることを特徴とする請求項 1~3 のいずれか 1 項に記載の形質転換体。

【請求項 5】 請求項 1~4 のいずれか 1 項に記載した形質転換体を培養することにより、3-ヒドロキシブチレートと 3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体を蓄積させることを特徴とする共重合体の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は共重合体ポリエステルおよびこれを醗酵合成する微生物に関し、自然環境（土中、河川、海中）の下で微生物の作用を受けて分解するプラスチック様高分子の製造方法に関するものである。さらに詳しくは、共重合体ポリエステルを醗酵合成する能力の改善された形質転換体、さらには、その形質転換体を利用した共重合体ポリエステルの製造方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】 現在まで数多くの微生物において、ポリエステルを菌体内に蓄積することが、知られている。その代表例としては、3-ヒドロキシブチレート（以下 3HB と呼ぶ）のホモポリマーであるポリ-3-ヒドロキシブチレート（以下 P(3HB) と呼ぶ）であり、その生産菌は数多く知られている（例えば、デービス (Dawes) ら、アドバンス・イン・マイクロバイオロジー・アンド・バイオフィジックス (Adv. Microbiol. Biophys.), 14 巻, 135 頁, 1973 年参照）。P(3HB) は、自然環境中で生物的に分解するプラスチック（以下生分解性プラスチックと呼ぶ）であるが、高分子材料としてみた場合、ホモポリマーであるために結晶性が高くかつ脆い性質を有しており、実用的には不十分であった。このような欠点を克服する方法として、コポリマーを生産する菌株のスクリーニングが行われた。特開昭 63-226291 号公報によれば、シュードモナスオレオボランス ATCC 29

347 に炭素源としてアルカンを与えることにより炭素数が 6-12 までの 3-ヒドロキシアルカノエート（以下 3HA と呼ぶ）をモノマーユニットとする共重合体（以下 P(3HA) と呼ぶ）を醗酵合成できた。しかし、この P(3HA) は、炭素数 6 から 12 までに広く分布した共重合体であり、且つ、側鎖のメチレン基数が多いことから、物性的には室温でゲル状の高分子である。このため、プラスチック材料としては融点が低過ぎるものであった。

【0003】 これに対し、ポリエステルを構成しているモノマーユニットとして、3HB 以外の構造的に異なるモノマーユニットを組み込むことが提案された。特開昭 57-150393 号公報、特開昭 58-69225 号公報、特開昭 63-269989 号公報、特開昭 64-48821 号公報、特開平 1-156320 号公報によれば、アルカリゲネス ユートロファスを用い、炭素源として炭素数が奇数個のカルボン酸、例えば、プロピオン酸や吉草酸を与えることにより、3HB と  $\beta$ -ヒドロキシバリレート（以下 3HV と呼ぶ）との共重合体（以下 P(3HB-CO-3HV) と呼ぶ）が得られる。同様に、炭素源として、4-ヒドロキシ酪酸や  $\gamma$ -ブチロラクトンを与えることにより、3HB と 4-ヒドロキシブチレート（4HB）との共重合体（以下 P(3HB-CO-4HB) と呼ぶ）が得られることが、報告されている。そして、この P(3HB-CO-3HV) や P(3HB-CO-4HB) は、3HV や 4HB の成分組成を高めることで P(3HB) の脆性を改良し、プラスチックとして加工性にも広がりを持つ性質を有しているので実用的な生分解性プラスチックとして注目されている。しかし、このようなコポリマーを微生物内で醗酵合成させるには、3HB のユニット成分を作るための炭素源（通常は、グルコース、シュクロースのような糖類や酢酸、メタノール、エタノール、グリセリン等）と、3HV や 4HB のようなコポリマーのユニット成分を作るための中間体（3HV を作る場合は、プロピオン酸、吉草酸、4HB を作る場合は 1, 4-ブタンジオール、 $\gamma$ -ブチロラクトン）とを培地に添加しなければならず、しかもこのような原料は高価であるために培養コストが高くなる欠点を有していた。

【0004】 他方、この P(3HB-CO-3HV) や P(3HB-CO-4HB) の欠点を克服する方法として、アエロモナス属の菌株を用いることが提案された。特開平 5-93049 号公報によれば、アエロモナス属の菌株 FA440 や OLE-338 を用い、非常に安価な天然油脂を炭素源として 3-ヒドロキシブチレートと 3-ヒドロキシヘキサノエートの共重合体（以下 P(3HB-CO-3HHx) が得られている。そして、この共重合体は可塑性が高く柔軟性があるため、P(3HB-CO-3HV) や P(3HB-CO-4HB) よりもポリマー物性が優れているだけでなく、高価な原料（炭素

源)を培地に添加する必要がないことから、安価なコストでの生産が期待された。しかしながら、アエロモナス属の菌株の特徴は脂肪酸の $\beta$ -酸化経路の中間代謝物である3-ヒドロキシシロコAからポリエステル合成が進むルートがメインであり、 $\beta$ -酸化の主生成物であるアセチルシロコAが有効に利用されないことや、P(3HB-CO-3HHx)の合成酵素活性が低いことなどが原因となって、菌体内ポリエステル蓄積が抑制されることが明らかとなっている。従って、安価な天然油脂を炭素源として利用できても生産性が低く、炭素源収率も低いという課題が残されていた。従って、本発明の目的は、アエロモナス属菌のP(3HB-CO-3HHx)の合成酵素活性を高めるため、P(3HB-CO-3HHx)の合成酵素遺伝子等によって形質転換された形質転換体を提供することにある。また、本発明の他の目的は、かかる形質転換体を用いるP(3HB-CO-3HHx)等の共重合体を製造する方法を提供することにある。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者は、アエロモナス属の菌株が優れたポリエステルを蓄積出来るにもかかわらず、菌体中の蓄積量と炭素収率が低いために工業的に利用できないという欠点に着目し、この菌体中の蓄積量と炭素収率を高めるため鋭意研究を行った。その結果、アエロモナス属のポリエステル合成に関与する遺伝子群を、適当な宿主に移入した形質転換株が、著量のポリエステルを合成し、炭素収率も非常に優れていることを発見し、さらに研究をすすめて本発明を完成するに至った。即ち、本発明の要旨は、(1) 3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体の合成遺伝子を含有するベクタープラスミドを宿主菌体内に移入して得られる形質転換体、(2)

さらに $\beta$ -ケトチオラゼ遺伝子および/またはアセトアセチルシロコAリダクターゼ遺伝子が組み込まれたベクタープラスミドを宿主菌体内に移入して得られる

(1)記載の形質転換体、(3) 宿主菌がアエロモナス属の菌株であることを特徴とする(1)または(2)に記載の形質転換体、(4) ベクタープラスミドがpLA2917、pLA2905、pLA2910、pLA2901、pRK248、pRK290、pLAFR1、pVK100、pVK101、pVK102よりなる群から選択されるものであることを特徴とする(1)~(3)のいずれかに記載の形質転換体、並びに(5)

(1)~(4)のいずれかに記載した形質転換体を培養することにより、3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体を蓄積させることを特徴とする共重合体の製造方法、に関する。以下に本発明を詳細に説明する。

【0006】1. 共重合体の合成遺伝子によって形質転換された形質転換体の取得方法

P(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子によって形質転換された本発明の形質転換体を取得するためには以下の方法を採るのが便宜である。まず、P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株より遺伝子ライブラリーを作成し、次いでP(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子が欠損した合成能欠損変異株に入れ、最後にP(3HB-CO-3HHx)の合成能が回復した菌株を選別すれば、P(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子によって形質転換された本発明の形質転換体を得ることができる。

【0007】① P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株より遺伝子ライブラリーを作成するためには、P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株から染色体DNAを抽出精製し、制限酵素により切断した後に適当な長さのDNA断片を分離し、ベクタープラスミドと結合することにより得られる。

【0008】P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株とは、アエロモナス属の菌株であればいずれでもよく、例えば、アエロモナス キャビエ FA440株、アエロモナス ハイドロフィラ OLE-338株などが挙げられる。

【0009】P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株より染色体DNAを抽出精製する方法としては、例えば、マーマー(Marmur)らの方法(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 3巻, 208頁, 1961年)が挙げられる。染色体を切断する際に用いる制限酵素は、ベクタープラスミドに対応する制限酵素であればいずれでもよく、宝酒造、ファルマシア、バイオラッド社などから容易に入手できる。また、切断されたDNA断片から適当な長さのDNAを抽出するが、ここで適当な長さとは、通常のベクターを用いるときは5000~20000塩基対程度、コスミドあるいはファージベクターを用いるときは15000~30000塩基対程度を意味する。DNA断片から適当な長さを取り出す方法としては、蔗糖密度勾配を用いる方法やアガロースゲルを用いる方法(モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), 150頁, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)出版(1982年)参照)などいずれでもよく、例えば、RK2の複製に関与する領域を有するベクタープラスミド、例えば、pRK229、pRK248(ジャーナル・オブ・バクテリオロジー, 141巻, 219頁, 1980年参照)、pRK290(プロシーディング・ナショナル・アカデミー・サイエンス・オブ・USA, 77巻, 7347頁, 1980年)、pLA2901、pLA2905、pLA2910、pLA2917(ジャーナル・オブ・バクテリオロジー, 161巻, 955頁, 1985年参照)、pLAFR1(ジーン(Gene), 18巻, 289頁, 1982年参照)、pVK100、pVK10

1, pVK102 (プラスミド(Plasmid), 8巻, 45頁, 1982年)、あるいは、RK2の複製に関する領域を制限酵素で切り出し加工したものなどが挙げられる。

【0010】ベクタープラスミドは、染色体DNAを断片化する際に使用した制限酵素の塩基配列に対応する制限酵素を用いて切断した後、適当な長さにされた染色体DNA断片と連結する。この連結は、T4DNAリガーゼを用いればよく、例えばライゲーションキット(宝酒造(株)など)を用いて行うことができる。これにより、様々な遺伝子の断片とベクタープラスミドを結合した混合物(以下、遺伝子ライブラリーと呼ぶ)を得ることができる。あるいは、遺伝子ライブラリーにおいて、適当な長さの染色体DNA断片を用いる代わりに、P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株からmRNAを抽出精製し、mRNAを精製した後それからcDNA断片を合成する方法(モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)出版(1982年)参照)を利用してよい。また、遺伝子ライブラリーを、大腸菌に一度形質転換あるいは形質導入した後、遺伝子ライブラリーを大量に精製することもできる(モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning), コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory)出版(1982年)参照)。

【0011】② 次に、P(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子が欠損した変異株(以下合成能欠損変異株と呼ぶ)を取得するためには、P(3HB-CO-3HHx)を合成できる菌株に変異処理を施した後、炭素数6以上の油脂関連物質を唯一の炭素源とする培地で増殖でき、炭素数6以上の油脂関連物質を唯一の炭素源としてP(3HB-CO-3HHx)を合成できる培地でP(3HB-CO-3HHx)を合成できない菌株を選別すればよい。

【0012】ここで、変異処理はいずれの方法でもよく、例えば、紫外線、X線、γ線などによる変異、N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニン、エチルメタンスルホン酸などの変異剤による処理などいずれでもよい。

【0013】炭素数6以上の油脂関連物質を唯一の炭素源とする培地とは、炭素源として炭素数6以上の油脂関連物質以外を含有しない培地であり、例えば、デービス(Davis)の最少培地やM9最少培地に増殖に最小限必要なビタミンとミネラルを添加したものを基本培地とし、グルコースを炭素数6以上の油脂関連物質に置き換えた培地である。炭素数6以上の油脂関連物質を唯一の炭素源としてP(3HB-CO-4HHx)を合成できる培地とは、炭素源として炭素数6以上の油脂関連物質以外を含有せず、且つ、炭素源に対して窒素源を十分制限し

た培地であり、例えば、デービス(Davis)の最少培地やM9最少培地に増殖に最小限必要なビタミンとミネラルを添加したものを基本培地とし、グルコースを炭素数6以上の油脂関連物質に置き換え、硫酸アンモニウムなどの窒素源を通常の1/5以下にした培地である。

【0014】炭素数6以上の油脂関連物質として、天然油脂、例えば、コーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、パーム油、ナタネ油、魚油、鯨油、豚油、牛油など、脂肪酸、例えば、ヘキサン酸、デカン酸、オクタン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノレン酸、リノール酸、ミリスチン酸など、あるいは、これら脂肪酸のエステル、あるいは、アルコール、例えば、オクタノール、ラウリルアルコール、オレイルアルコール、パルミチルアルコールなど、あるいはこれらアルコールのエステルなどが挙げられる。

【0015】変異処理を施した菌株について、P(3HB-CO-3HHx)合成の有無を調べる方法としては、例えば、スタンブラックBにより染色する方法(アキープス・オブ・バイオテクノロジー(Archives of Biotechnology), 71巻, 283頁, 1970年)、位相差顕微鏡により蓄積を調べる方法などいずれでもよい。また、変異株をサッカロースやパーコールの濃度勾配法(アキープス・オブ・バイオテクノロジー(Archives of Biotechnology), 143巻, 178頁, 1985年)により合成能欠損変異株の濃縮をしてから選別を行ってもよい。そして、共重合体P(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子の入った形質転換体を得るためには、合成能欠損変異株に遺伝子ライブラリーを形質転換あるいは形質導入した後、炭素数6以上の油脂関連物質を唯一の炭素源としてP(3HB-CO-3HHx)を合成できる培地でP(3HB-CO-3HHx)の合成能が修復した菌株(以下、合成能修復株と呼ぶ)を選別すればよい。

【0016】合成能欠損変異株へ遺伝子ライブラリーを形質転換する方法は、一般に利用される方法でよく、例えば、塩化カルシウム法(ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(Journal of Molecular Biology), 53巻, 159頁, 1970年参照)、塩化リビジウム法(メソーズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 68巻, 253頁, 1979年参照)、低pH法(遺伝子操作マニュアル(講社サイエンティフィック出版)参照)などが挙げられる。また、コスミドベクターやファージベクターを利用する場合の形質導入は、一般に利用される方法でよく、例えば、市販のin vitroパッケージングキット(例えば、宝酒造(株)製)が利用できる。また、ベクタープラスミドが、プラスミドRK2に存在するtrfA、trfB、rlx領域を含んでいる場合、接合法(ジャーナル・オブ・バクテリオロジー, 161巻, 955頁, 1985

年参照)により形質導入できる。炭素数6以上の油脂関連物質を唯一の炭素源としてP(3HB-CO-3HHx)を合成できる培地は、既に記載した合成能欠損変異株を取得する場合の培地と同一でよく、P(3HB-CO-3HHx)の合成の有無を調べる方法も、既に記載した合成能欠損変異株を取得する場合に使用した方法と同じでよい。

【0017】また、 $\beta$ -ケートチオラーゼは、アセチルCoAからアセトアセチルCoAを合成し、アセトアセチルCoAリダクターゼは、アセトアセチルCoAから $\beta$ -ヒドロキシブチルCoAを合成する。この $\beta$ -ヒドロキシブチルCoAは、P(3HB)合成のための3HBのモノマーユニットである。従って、 $\beta$ -ケートチオラーゼおよび/またはアセトアセチルCoAリダクターゼ活性の低い菌体では、菌体が炭素源を代謝する過程で多量に合成されるアセチルCoAを、P(3HB-CO-3HHx)合成の3HBのモノマーユニットとして十分に使えない。これに対し、P(3HB-CO-3HHx)合成遺伝子の他に、 $\beta$ -ケートチオラーゼおよび/またはアセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子が導入された形質転換体は、 $\beta$ -ケートチオラーゼおよび/またはアセトアセチルCoAリダクターゼ活性が上昇しており、アセチルCoAを、P(3HB-CO-3HHx)合成の3HBのモノマーユニットとして十分に使用できる。それゆえ、炭素数6以上の炭素源以外の物質を唯一の炭素源とし、窒素源を制限した培地で培養した場合、P(3HB)を高濃度に蓄積することができる。これらの遺伝子は、P(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子に近接して存在している。それゆえ、既に記載した合成能修復株のなかには、P(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子を有し、且つ、 $\beta$ -ケートチオラーゼおよびアセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子を有していない形質転換体とP(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子を有し、且つ、 $\beta$ -ケートチオラーゼ遺伝子とアセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子の両方、あるいはその一方を有する形質転換体が存在する。

【0018】③ 最後に、本発明の形質転換体を選別するには、合成能修復株を炭素数6以上の油脂関連物質以外の物質を唯一の炭素源とし、窒素源を制限した培地で培養した後、重合体(3HB)を高濃度に蓄積している菌株を選択すればよい。炭素数6以上の油脂関連物質以外の炭素源としては、糖類、例えば、グルコース、サッカロース、マルトース、フラクトース、ガラクトース、でんぷん、でんぷん加水分解物など、低級アルコール類、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなど、グリセリン、有機酸類、例えば、酢酸、アセト酢酸、クエン酸、コハク酸、酒石酸、乳酸、グルコン酸などが挙げられる。

【0019】蓄積量を調べる方法は、既に記載した方法でよく、例えば、スダンブラックBにより染色する方

法、顕微鏡により蓄積を調べる方法などいずれでもよいし、ポリマーを回収し重量を測定する方法、例えば、培養終了後、菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄し、滅菌乾燥して得られる乾燥菌体をクロロホルム等を用いて、抽出処理し、遠心分離後、濾過等により菌体成分を除去後、抽出液にメタノールを加えて共重合体を沈澱回収する方法でもよい。さらに、形質転換体について直接 $\beta$ -ケートチオラーゼおよびアセトアセチルCoAリダクターゼ活性を測定してもよい(例えば、セニア(Senior)らの方法、バイオケミカル・ジャーナル(Biochemical Journal), 125巻, 55頁, 1971年参照)。

【0020】アエロモナス属の菌株を宿主とした場合の形質転換体は、宿主内に入れられたベクタープラスミド上の遺伝子の大部分は、多コピー数が染色体内に挿入される。それゆえ、P(3HB-CO-3HHx)の生産には、これらの形質転換体を直接使用することができる。

【0021】また、P(3HB-CO-3HHx)をアエロモナス属以外の菌株で生産することも可能である。この場合、例えば、形質転換体よりプラスミドを抽出精製したものを、大腸菌に入れた後、プラスミドを精製し、プラスミドをそのまま、あるいは、目的の宿主で発現可能なベクターに連結しなおした後、目的の宿主にプラスミドを入れればよい。

【0022】アエロモナス属からのプラスミドの精製および大腸菌からのプラスミドの精製方法は、通常の方法でよく、例えば、アルカリ法(メソーズ・イン・エンザイモロジー(Methods in Enzymology), 100巻, 243頁, 1983年発刊)が使用できる。また、大腸菌や目的の宿主にプラスミドを入れる方法は、既に述べた合成能欠損変異株へ遺伝子ライブラリーを形質転換した時と同じ方法、例えば、塩化カルシウム法、塩化ルビジウム法、低pH法など、コスミドベクターやファージベクターを利用する場合の形質導入法例えば、市販のin vitroパッケージキットを用いる方法など、接合法などが挙げられる。

【0023】目的の宿主としては、炭素数6以上の油脂関連物質を代謝できる微生物であればいずれでもよく、バクテリアとして、グラム陰性バクテリア、例えば、エシェリヒア(Escherichia)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、アルカリゲネス属(Alcaligenes)、アグロバクテリウム(Agrobacterium)属、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、ビブリオ(Vibrio)属、エンテロバクター(Enterobacter)属、リゾビウム(Rhizobium)属、グルコノバクター(Gluconobacter)属など、グラム陽性バクテリア、例えば、バシルス(Bacillus)属、クロストリジウム(Clostridium)属、ラクトバシルス(Lactobacillus)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、アルスロバクター(Arthrobacter)属、ストレプトコッカス(Streptococcus)属など、また放線菌として、ストレ

プトマイセス(*Streptomyces*)属、アクチノマイセス(*Actinomyces*)属、ノカルディア(*Nocardia*)属などが挙げられる。また、酵母、かびでもよい。

【0024】2. 形質転換体を用いた共重合体の培養方法及び抽出精製法

P(3HB-CO-3HHx)を醗酵合成するためには、形質転換体に炭素数6以上の油脂関連物質を含む炭素源を与え、炭素源以外の栄養源である窒素源、無機塩、その他の有機栄養源のいずれかを制限した培地(pHは中性ないし微アルカリ性)、例えば、窒素源を0.5~8%に制限した培地で、培養温度は25~38℃の範囲で、好氣的に1~4日培養することにより、P(3HB-CO-3HHx)を顆粒として菌体内に蓄積させ、その後、この共重合体を回収すればよい。あるいは、P(3HB-CO-3HHx)を醗酵合成するためには、形質転換体に炭素数6以上の油脂関連物質を含む炭素源あるいは炭素数6以上の油脂関連物質を含まない炭素源を与え、炭素源以外の栄養源である窒素源、無機塩、その他の有機栄養源を制限しない培地で、pHは中性~微アルカリ性、培養温度は25~38℃の範囲で、好氣的に1~4日培養した後、炭素数6以上の油脂関連物質を含む炭素源を与え、炭素源以外の栄養源である窒素源、無機塩、その他の有機栄養源のいずれか、例えば、窒素源を制限した培地で、pHは中性~微アルカリ性、培養温度は25~38℃の範囲で、好氣的に1~4日培養することにより、P(3HB-CO-3HHx)顆粒として菌体内に蓄積させ、その後、この共重合体を回収すればよい。また、培養は半回分培養してもよいし、連続的に培養してもよい。

【0025】炭素源以外の栄養源として窒素源を制限する場合、炭素源は窒素源の5倍以上重量を与えることが好ましい。また、炭素数6以上の油脂関連物質を含む炭素源は、炭素数6以上の油脂関連物質と油脂関連物質以外の炭素源からなり、これらの量比は、目的のP(3HB-CO-3HHx)の組成に応じて適宜換えればよい。炭素数6以上の油脂関連物質の量比が高いほど、3HHxが豊富な共重合体を得られる。

【0026】炭素数6以上の油脂関連物質としては、既に述べたように、天然油脂、例えば、コーン油、大豆油、サフラワー油、サンフラワー油、オリーブ油、ヤシ油、パーム油、ナタネ油、魚油、鯨油、豚油、牛油など、脂肪酸、例えば、カブロン酸、デカン酸、オクタン酸、ラウリン酸、オレイン酸、パルミチン酸、リノレン酸、リノール酸、ミリスチン酸など、あるいは、これら脂肪酸のエステル、あるいは、アルコール、例えば、オクタノール、ラウリルアルコール、オレイルアルコール、パルミチルアルコールなど、あるいはこれらアルコールのエステルなどが挙げられる。

【0027】炭素数6以上の油脂関連物質以外の炭素源としては、糖類、例えば、グルコース、サッカロース、

マルトース、フラクトース、ガラクトース、でんぷん、でんぷん加水分解物など、低級アルコール類、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなど、グリセリン、有機酸類、例えば、酢酸、アセト酢酸、プロピオン酸、クエン酸、コハク酸、酒石酸、乳酸、グルコン酸などが挙げられる。窒素源としては、アンモニウム塩、例えば、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、コハク酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなど、硝酸塩、例えば、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなど、また、アンモニア水、アンモニアガス、尿素、アミノ酸、ペプチド、核酸関連物質などが挙げられる。無機塩としては、リン酸塩、例えば、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カルシウムなど、カリウム塩、例えば、塩化カリウムなど、カルシウム塩、例えば、塩化カルシウムなど、マグネシウム塩、例えば、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウムなど、ナトリウム塩、例えば、塩化ナトリウム、炭酸ナトリウムなど、マンガン塩、例えば、硫酸マンガン、塩化マンガンなど、重金属塩、例えば、鉄、亜鉛、銅、コバルトなどの塩化物、硫酸化物、硝酸化物などが挙げられる。

【0028】その他の有機栄養源としては、アミノ酸、例えば、グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリン、アスパラギン酸、オルニチン、プロリン、チロシンなど、ペプチド類、例えば、ペプトン、カザミノ酸、グリシルグリシン、アラニルアラニン、アラニルグリシンなど、ビタミン類、例えば、ビタミンB1、ビタミンC、ビタミンB12、ビオチンなど、天然由来物質、例えば、酵母エキス、肉エキス、麦芽、麦芽エキス、コーンスティプリカー、大豆粉、米ぬか、大豆蛋白分解物、カゼイン分解物など、核酸関連物質、例えば、ウラシル、シトシン、チミン、アデニン、プリン、これらとリボース、デオキシリボースからなるヌクレオチドなどが挙げられる。

【0029】醗酵合成された共重合体の菌体からの回収は、常法により行うことができる。例えば、培養終了後、菌体を蒸留水およびメタノール等により洗浄し、滅菌乾燥して得られる乾燥菌体をクロロホルム等を用いて、抽出処理し、遠心分離後、濾過等により菌体成分を除去し、得られる抽出液にメタノールを加えて共重合体を沈澱回収することができる。

【0030】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明を説明するが、本発明はかかる実施例に限定されるものではない。  
実施例1

最初に、ポリエステル合成能欠損変異株を取得した。アエロモナス属の菌株として、アエロモナス キャビエ(*Aeromonas caviae*)FA440株を使用した。アエロモナス キャビエ FA440をN-メチル-N-ニトロソグアニジン処理(生物工学実験書、66頁、社団法人日



本生物工学会編（培風館出版）参照）を施し、変異を行った。そして、1プレート当たりコロニーが約100個になるようにMM（0.5%グルコース、0.01%硫酸マグネシウム、0.3%磷酸ニカリウム、0.7%磷酸一カリウム、0.1%硫酸アンモニウム、0.01%イーストエキス、pH7.0）寒天培地に菌体懸濁液を塗布し、30℃で5日間インキュベートした。得られたコロニー10000個に対して、MM寒天培地と、MPA（0.15%パルミチン酸、0.01%硫酸マグネシウム、0.7%リン酸ニカリウム、0.3%リン酸一カリウム、0.1%硫酸アンモニウム、0.01%イーストエキス、1ml/100mlトリトンX-100）寒天培地と、MNP（0.15%パルミチン酸、0.01%硫酸マグネシウム、0.7%リン酸ニカリウム、0.3%リン酸一カリウム、0.01%硫酸アンモニウム、0.01%イーストエキス、1ml/100mlトリトンX-100、pH7.0）寒天培地とに、それぞれのコロニーをレプリカした。そして、MNP寒天培地のプレートを30℃で5日間インキュベートした後、スタンブラックB法により、ポリエステルを染色した。即ち、200mg/リットルのスタンブラックBを含む95%のエタノール溶液を10mlずつ各プレートに注ぎ、30分間放置した後、溶液を除去し、95%のエタノール溶液で1回プレートを洗浄した。その結果、MM培地とMPA培地で増殖し、且つ、MNP培地で青色に染色されていないコロニーを5個得た。それらを位相差顕微鏡（オリンパスBH2、1000倍）で観察し、ポリエステルが蓄積していないことを確認した。これら、ポリエステル合成遺伝子の欠損株（合成能欠損変異株）のひとつをAC004と呼ぶ。

#### 【0031】実施例2

次に、アエロモナスの遺伝子ライブラリーを作成した。アエロモナス キャビエ FA440株を200mlのLB培地（1%イーストエキス、0.5%バクトペプトン、0.5%塩化ナトリウム、0.1%グルコース、pH7.2）中、30℃で一昼夜培養した後、10000rpmで10分間遠心分離することにより集菌した。そして、この菌体を0.01Mのトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン-0.001Mのエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム溶液（以下TE溶液と呼ぶ）50mlに懸濁し、50mgの塩化リゾチームを添加した後、4℃で30分間放置した。さらに、50mlの1%のラウリル硫酸ナトリウムを含有するTE溶液を添加し、70℃で20分間放置した。この液を室温まで冷却後、100mlのフェノールクロロホルム溶液（容量比1:1）を添加して静かに撹拌した後、10000rpmで10分間遠心分離し、上澄みをパスツールピペットで静かに取りだした。そして、フェノールクロロホルム溶液（容量比1:1）の代わりに、100mlのクロロホルム溶液を用いて同様の操作を行い、上澄みをパスツ

ルピペットで静かに取りだし、ビーカーに入れた。この上澄み液に-20℃に冷却したエタノールを少しずつ添加しながら、析出してきた染色体DNAをガラス棒で巻き取ることにより、アエロモナス キャビエ FA440の染色体DNAを得た。

【0032】得られた染色体DNAを、制限酵素Sau3AIで部分分解した後、透析チューブ法（モレキュラー クローニング（Molecular cloning）, 164頁, コールド スプリング ハーバー ラボラトリー（Cold Spring Harbar Laboratory）出版参照）により、5~15キロ塩基対のDNA断片を分離精製した。他方、ベクタープラスミドは、アエロモナス属で発現可能なpLA2917を使用した。このプラスミドを制限酵素BglIIで切断し、脱燐酸化処理（モレキュラー クローニング（Molecular cloning）, 133頁, コールド スプリング ハーバーラボラトリー（Cold Spring Harbar Laboratory）出版参照）を施した後、精製した染色体DNA断片（遺伝子ライブラリー溶液と呼ぶ）と連結した。

【0033】形質転換は、塩化カルシウム法を用いて行った。即ち、大腸菌DH1株を1mlのLB培地に一白金耳接種し、37℃で一昼夜振盪培養した。そして、0.05mlの培養液を5mlのLB培地に入れ、37℃でさらに2時間培養した。その後、培養液を10000rpmで10分間遠心分離して菌体を回収した後、0.1ml/1の塩化カルシウム溶液2mlに懸濁して4℃で2時間放置した。その後、再び10000rpmで10分間遠心分離して菌体を回収した後、0.1mol/1の塩化カルシウム-0.01mol/1のトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン溶液0.2mlに懸濁し、遺伝子ライブラリー溶液0.01mlを添加し、さらに45分間放置した。そして、42℃で2分間放置した後、1.8mlのLB培地を添加して37℃でさらに2時間放置し、この菌体を集菌した後に25mg/mlのテトラサイクリンを含有するLB寒天培地上に塗布し、37℃で24時間インキュベートした。その結果、10<sup>5</sup>個程度のテトラサイクリンに耐性を示すコロニーが得られた。得られたテトラサイクリンに耐性を示すこれらのコロニーよりアルカリ法（メソーズ・イン・エンザイモロジー（Methods in Enzymology）, 100巻, 243頁, 1983年発行）を用いて、プラスミドを粗精製した後、超遠心分離法（モレキュラー クローニング（Molecular cloning）, 150頁, コールド スプリング ハーバー ラボラトリー（Cold Spring Harbar Laboratory）出版）を用いてプラスミドの精製を行った。このようにして、精製された遺伝子ライブラリーを得た。

#### 【0034】実施例3

アエロモナスの菌株として、実施例1で取得したアエロモナス キャビエ（*Aeromonas caviae*）AC004株の抗生物質に対する耐性を調べたところ、テトラサイクリン、カナマイシンに感受性であり、アンピシリンには耐



性を示した。そこで、テトラサイクリンをマーカーとして使用した。アエロモナス キャビエ AC004に実施例2で作成した遺伝子ライブラリーを、実施例2の大腸菌DH1の時と同様に、塩化カルシウム法により形質転換した後、テトラサイクリンを含有するLB培地に塗布し、30℃で一昼夜インキュベートした。その結果、 $10^5$  個程度のテトラサイクリンに耐性を示すコロニーを得た。

【0035】得られたテトラサイクリンに耐性を示すそれぞれのコロニーをテトラサイクリンを含有するMM寒天培地とテトラサイクリンを含有するMNP寒天培地とにつまようじで10000個レプリカした。テトラサイクリンを含有するMM寒天培地のプレートは、30℃で3日間インキュベートした後4℃の冷蔵庫の中で保存した。一方、テトラサイクリンを含有するMNP寒天培地のプレートは、30℃で5日間インキュベートした後、前述のスダンブラック法により染色した。その結果、スダンブラックにより青色に染色されるコロニーを3個得た。さらに、実施例1と同様に位相差顕微鏡を用いて観察し、ポリエステルの顆粒が蓄積していることを確認した。こうして、P(3HB-CO-3HHx)の合成遺伝子を含む断片がクローニングされたコロニーを3個得た。それらのうちの1個のコロニーを、以下AC118株と呼ぶ。

【0036】アエロモナス キャビエ FA440、AC004、AC118を10mlのLB培地(AC118はテトラサイクリンを含有したLB培地)の入った三角フラスコ中30℃で24時間振盪培養した。その後、それぞれの菌を集め、1mlの生理食塩水に懸濁したものを、100mlの、M9G(0.6%リン酸二ナトリウム、0.3%リン酸一カリウム、0.05%塩化ナトリウム、0.01%塩化アンモニウム、0.024%塩化マグネシウム、0.001%塩化カルシウム、1%グルコース、0.01%イーストエキス)培地に入れ、30℃で48時間振盪培養した。得られた培養液中1mlを遠心分離して菌体を集め、位相差顕微鏡により、菌体の蓄積状況を調べた。残り99mlより得られた菌を集め、蒸留水で2回菌体を洗浄し、エタノールで1回洗浄した後、菌体を集め、乾燥した後、乾燥菌体重量を測定した。その後、クロロホルム15mlに乾燥菌体を懸濁し50℃で2時間放置した。そして、ワットマンNo.

1の濾紙により濾過し、さらに、メンブランフィルター(アドバンテック社製、PTFEタイプT050A047A)により濾過することにより、菌体残渣を取り除いた。さらに、このクロロホルム溶液に40mlのメタノールを添加し、ポリエステルを沈殿させた。沈殿物を遠心分離し、上澄み液を除去した後、乾燥してポリエステルを得た。

【0037】全ポリエステル重量を測定した後、得られたポリエステル5~7mgをクロロホルム1mlに溶解し、0.85mlのメタノールと0.15mlの濃硫酸を添加して密栓し、100℃で140分間放置することにより、ポリマーの分解物のメチルエステル体を得た。これを、0℃の氷水で十分冷却し、硫酸アンモニウムで飽和した蒸留水0.5mlを添加し激しく攪拌した。静置して2層に分離させた後、下部の有機層を注意深く抽出しその組成を分析した。分析には、キャピラリーガスクロマトグラフィーを使用した。キャピラリーガスクロマトグラフは、HP5890II(ヒューレット パッカード社製)を用いて行った。使用したカラムは、J&W社製のヒューズド シリカ キャピラリーカラムDB-5(カラム内径0.25mm、液膜厚0.25 $\mu$ m、カラム長30m)である。また、温度は、初発温度60℃で30分間行い、その後8℃/分の速度で昇温して、最終温度240℃を3分間行った。得られた結果を表1(上側)に示す。表1において、AC118のみが、グルコースを唯一の炭素源としてP(3HB)を蓄積できた。さらに、セニア(Senior)らの方法(バイオケミカル・ジャーナル(Biochemical Journal), 125巻, 55頁, 1971年参照)に従って、 $\beta$ -ケトチオラーゼ活性とアセトアセチルCoAリダクターゼ活性を測定した結果、AC118株はFA440株に対してこれらの活性がそれぞれ2倍、1.5倍上昇していた。従って、AC118株にクローニングされたDNA断片には、3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシヘキサノエートにより構成される共重合体の合成遺伝子、及び、 $\beta$ -ケトチオラーゼ遺伝子、及び、アセトアセチルCoAリダクターゼ遺伝子が存在しており、これらの遺伝子の発現により対応する酵素活性が上昇したものと結論できる。

【0038】

【表1】

炭 素 源	使用菌株	乾燥菌体重量 (g/l)	ポリエステル含 量 (g/g-乾燥菌体)	ポリエステル組 成 C6/C4(mol/mol)
グルコース	FA440	0.491	0.00	測定不能 <sup>a)</sup>
	AC004	0.430	0.00	測定不能 <sup>a)</sup>
	AC118	0.394	0.20	0.00
パルミチン酸	FA440	0.736	0.08	0.17
	AC004	0.730	0.00	測定不能 <sup>a)</sup>
	AC118	0.742	0.60	0.05

a) ポリエステルがほとんど合成されていないため測定できなかった。

#### 【0039】実施例 4

アエロモナス キャビエ FA440、AC004、AC118を10mlのLB培地（AC118はテトラサイクリンを含有したLB培地）の入った三角フラスコ中30℃で24時間振盪培養した。その後、それぞれの菌を集菌して1mlの生理食塩水に懸濁したものを、100mlのMNP培地に入れ、30℃で48時間振盪培養した。得られた培養液中1mlを遠心分離して菌体を集め、位相差顕微鏡により、菌体の蓄積状況を調べた。残り99mlより得られた菌を集め、実施例3と同様の方法でポリエステルを精製し、分析した。得られた結果を表1（下側）に示す。

【0040】親株であるFA440株では、ポリエステル含量及びポリエステル収率が非常に低いのに対し、AC118株では、ポリエステル含量が60%にも到達し、ポリエステル収率も著しく改善された。そして、本実験で得られたポリエステル含量は、アルカリゲネスユートロファスを用い、炭素源として炭素数が奇数個のカルボン酸を与えてP(3HB-CO-3HV)を得る方法よりも高い含量を得るものであるばかりか、非常に

安価な油脂類似物質を炭素源にするために、生産コストの面からも極めて優れた方法であることが判明した。

【0041】なお、本実施例で使用したアエロモナスキャビエ FA440株は、工業技術院微生物工業技術研究所（微工研）に平成3年6月11日付けで寄託されており、寄託番号は、微工研条寄第BP-3432号である。また、本実施例で得られたアエロモナスキャビエ AC118株は、工業技術院生命工学工業技術研究所（生命研）に平成6年2月2日付けで寄託されており、寄託番号は、生命研条寄第BP-4544号である。さらに、プラスミドpLA2917は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）の寄託番号37355としてそれぞれ分譲された。

#### 【0042】

【発明の効果】本発明の形質転換体および本発明の製造方法を用いることにより、3-ヒドロキシブチレートと3-ヒドロキシヘキサノエートから構成される共重合体を、安価な油脂や脂肪酸を原料に高収率で生産することができる。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

序内整理番号

F 1

技術表示箇所

C 1 2 R 1:01)

(C 1 2 P 7/62

C 1 2 R 1:01)

This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images problems checked, please do not report the problems to the IFW Image Problem Mailbox**